



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/22</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/41230</p> <p>(43) 国際公開日 1998年9月24日(24.09.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00999</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月11日(11.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/82162 1997年3月14日(14.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 神代正道(KOJIRO, Masamichi)[JP/JP] 〒810-0067 福岡県福岡市中央区伊崎6-1 Fukuoka, (JP) 矢野博久(YANO, Hirohisa)[JP/JP] 〒818-0036 福岡県筑紫野市光が丘4丁目5-2 Fukuoka, (JP) 家村昭日朗(TEMURA, Akihiro)[JP/JP] 〒830-0003 福岡県久留米市東櫛原町771-5 A-2 Fukuoka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PREVENTIVE AND/OR THERAPEUTIC AGENT FOR CACHEXIA</p> <p>(54)発明の名称 悪液質予防及び／又は治療剤</p> <p>(57) Abstract A preventive and/or therapeutic agent for cachexia, containing tumor cytotoxic factor II (TCF-II) as the active ingredient. This agent is excellently effective in the prevention and/or therapy of cachexia caused by cancer, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), heart diseases, infectious diseases, shock, burn, endotoxemia, organ inflammation, surgical operation, diabetes, collagen disease, radiation therapy or chemotherapy, thus being useful as a drug.</p>		

(57) 要約

本発明は腫瘍細胞障害因子-II(Tumor Cytotoxic Factor-II;TCF-II)を有効成分とする、悪液質予防及び／又は治療剤を提供する。本発明の剤は、癌、後天性免疫不全症候群(AIDS)、心臓疾患、感染症、ショック、熱傷、エンドトキシン血症、臓器炎、手術、糖尿病、膠原病、放射線治療、又は化学療法などの要因に基づき発症した悪液質に対する優れた予防及び／又は治療剤が提供され、医薬として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FR	フランス	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	ST	セント・ヘレナ
AT	オーストリア	GR	ギリシャ	MC	モナコ	TD	チャド
BA	ボスニア	IE	アイルランド	MD	モルドバ	TM	タタリスタン
BB	バハマ	IT	イタリア	MK	マケドニア	TT	トリニダード
BE	ベルギー	JP	日本	ML	マリ	TR	トルコ
BF	ブルキナファソ	KE	ケニア	MN	モンゴル	TC	タークス・カコス
BG	ブルガリア	KR	韓国	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	LA	ラオス	MW	マラウイ	US	アメリカ合衆国
BS	バハマ	LC	セント・ルシア	MX	メキシコ	VE	ベネズエラ
BZ	ベリーズ	LI	リヒテンシュタイン	NI	ニカラガ	W	世界
CA	カナダ	LK	スリランカ	NL	オランダ		
CC	ココス	LU	ルクセンブルグ	NO	ノルウェー		
CD	コンゴ	LV	ラトヴィア	NZ	ニュージーランド		
CF	中央アフリカ	MA	モロッコ	PA	パナマ		
CG	コンゴ	MC	モナコ	PE	ペルー		
CH	スイス	MD	モルドバ	PG	パプアニューギニア		
CI	コートジボワール	ME	モンテネグロ	PH	フィリピン		
CK	クック	ML	マリ	PK	パキスタン		
CL	チリ	MN	モンゴル	PL	ポーランド		
		MR	モーリタニア	PT	ポルトガル		
		MW	マラウイ	RO	ルーマニア		
		MX	メキシコ	RU	ロシア		
		NI	ニカラガ	SA	サウジアラビア		
		NL	オランダ	SD	スーダン		
		NO	ノルウェー	SE	スウェーデン		
		NZ	ニュージーランド	SG	シンガポール		
		PA	パナマ	SI	スロベニア		
		PE	ペルー	SK	スロバキア		
		PG	パプアニューギニア	SV	エルサルバドル		
		PH	フィリピン	TD	チャド		
		PK	パキスタン	TM	タタリスタン		
		PL	ポーランド	TT	トリニダード		
		PT	ポルトガル	TR	トルコ		
		RO	ルーマニア	TC	タークス・カコス		
		RU	ロシア	UG	ウガンダ		
		SA	サウジアラビア	US	アメリカ合衆国		
		SD	スーダン	VE	ベネズエラ		
		SE	スウェーデン	W	世界		
		SG	シンガポール				
		SI	スロベニア				
		SK	スロバキア				
		SV	エルサルバドル				
		TD	チャド				
		TM	タタリスタン				
		TT	トリニダード				
		TR	トルコ				
		TC	タークス・カコス				
		UG	ウガンダ				
		US	アメリカ合衆国				
		VE	ベネズエラ				
		W	世界				

## 明 細 書

## 悪液質予防及び／又は治療剤

技術分野

本発明は、腫瘍細胞障害因子-II(Tumor Cytotoxic Factor-II ; T C F - II)を有効成分とする悪液質予防及び／又は治療剤に関する。本発明により、癌、後天性免疫不全症候群(A I D S)、心臓疾患、感染症、ショック、熱傷、エンドトキシン血症、臓器炎、手術、糖尿病、膠原病、放射線治療、又は化学療法からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した悪液質に対する優れた予防及び／又は治療剤が提供され、医薬として有用である。

背景技術

一般に癌、後天性免疫不全症候群(A I D S)、心臓疾患を初めとした疾患においては食欲不振、体重減少、体力消耗、衰弱、皮膚萎縮や乾燥、貧血、浮腫、血液凝固線溶系異常などを伴い、これらの病態を悪液質(cachexia)という。この全身衰弱症状に陥ることにより、患者はついには死亡する(玉熊正越ほか:医学のあゆみ, 149, 371-373 (1989))さらに、手術による根治が望めなくなった進行あるいは末期癌に、放射線療法や化学療法を積極的に行うと、上述のような特有な栄養低下を背景に、免疫能などの生体防御能が極端に低下し、生命をかえって短縮する事態が発生してしまうため、治療上の大きな問題点となっている。悪液質の成因はこれまで、栄養摂取量低下と疾患生体の栄養消費の上昇による出納の不均衡や、癌組織や病変部位から動員される体液性因子の、全身の代謝に及ぼす影響などで説明されてきた。このことから悪液質の改善には、圧倒的な栄養あるいはエネルギー不足を補い免疫能を高めるために、高カロリー輸液などの積極的な栄養投与が行われている。しかし、悪液質の状態では、投与されたエネルギーは患者の生命維持の目的には使用され難く、特に担癌生体では癌細胞の栄養

となり、その増殖を助ける結果となってしまうため、栄養補給のみでは満足な治療方法とは言えなかった。

近年、腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor; TNF)など、マクロファージから動員されるモノカインやサイトカインが悪液質の成因として注目されている。TNFは癌細胞を障害する因子として発見され、免疫担当細胞の1つで貪食作用を持つマクロファージなどが分泌することが明らかになっている。当初、直接殺細胞効果があり、強い抗腫瘍活性を有することから、抗癌剤として期待されていたが、近年になって、癌の患者や重症感染症患者の体重減少などの衰弱、即ち悪液質の原因となること、あるいは炎症反応を惹起する元凶のサイトカインであることが解明され、それ以降TNFの多様な作用が研究されている。TNFの主な作用は、(1) 破骨作用、(2) 細胞への脂質の取り込み阻害による高脂血症、(3) インターロイキン1やコロニー刺激因子の生産誘導、(4) 血管内皮細胞の障害、(5) 重症感染症で起こる外毒素ショックの仲介反応などである。これらのことから、TNFの上昇を抑制することにより各種の疾患の治療、即ち癌、後天性免疫不全症候群(AIDS)、心臓疾患、感染症、ショック、熱傷、エンドトキシン血症、臓器炎などに伴う悪液質、またはこれら疾患の治療、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患をはじめとした各種炎症性疾患の治療を目的とした薬剤の開発が望まれているが、いまだ満足したものが得られていないのが実状である。

#### 発明の開示

本発明者らは、悪液質に対する治療薬物を鋭意探索した結果、腫瘍細胞障害因子と知られているTCF-IIが、悪液質に対し優れた予防及び治療効果を有することを見出した。従って本発明は、TCF-IIを有効成分とする癌、後天性免疫不全症候群(AIDS)、心臓疾患、感染症、ショック、熱傷、エンドトキシン血症、臓器炎、手術、放射線治療、化学療法などの要因に基づき発症した悪液質の予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

本発明は、TCF-IIを有効成分とする悪液質予防及び／又は治療剤に関する。

本発明により、癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、心臓疾患、感染症、ショック、熱傷、エンドトキシン血症、臓器炎、手術、糖尿病、膠原病、放射線治療、又は化学療法からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した悪液質に対する優れた予防及び／又は治療剤が提供され、医薬として有用である。

特に、癌の要因に基づき発症した悪液質の予防及び／又は治療に有用である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1におけるTCF-IIのKYN-2細胞移植マウスの体重低下に対する改善効果を示す。図中、++は危険率1%以下( $P < 0.01$ )で有意差があることを、\*\*は危険率1%以下( $P < 0.01$ )でI群投与後に対して有意差があることを表す。

第2図は、実施例1におけるTCF-IIのKYN-3細胞移植マウスのヘマトクリット低下に対する改善効果を示す。図中、++は危険率1%以下( $P < 0.01$ )で有意差があることを表す。

第3図は、実施例1におけるTCF-IIのKYN-3細胞移植マウスの腹水中TNF値上昇に対する抑制効果を示す。図中、\*は危険率5%以下( $P < 0.05$ )でI群に対し有意差があることを、\*\*は危険率1%以下( $P < 0.01$ )でI群に対し有意差があることを表す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の有効成分であるTCF-IIは、ヒト線維芽細胞由来の公知の蛋白質であり、下記の特性を有する。

##### i) 分子量 (SDS電気泳動法)

非還元下 : 78,000 $\pm$ 2,000 又は74,000 $\pm$ 2,000

還元下 : 52,000 $\pm$ 2,000 (共通バンドA)

30,000 $\pm$ 2,000 (バンドB)

26,000 $\pm$ 2000 (バンドC)

ii) 等電点 : 7.4 ~ 8.6

上記TCF-IIは、ヒト線維芽細胞培養液を濃縮しイオン交換体に吸着させ、その溶出液をアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製する方法（W090/10651号公報）、あるいは遺伝子工学的手法（W092/01053号公報）によって得られる。

本発明の有効成分であるTCF-IIは、線維芽細胞由来のものを用いることが可能であり、又、W090/10651号公報に記載された遺伝子配列に基づいて、微生物や他の細胞により遺伝子組換え操作により生産されたものでもよい。又、W092/01053号公報に開示された遺伝子工学的手法により得られたものを用いてもよい。この時、宿主細胞又は微生物の違いによる糖鎖の異なったものや、糖鎖の結合していないものであっても使用可能であるが、好ましくは糖鎖の結合しているものを用いる。これらの方法により得られたTCF-IIは、通常の単離精製法によってさらに濃縮、精製することができる。例えば、有機溶媒による沈殿法、塩析、ゲル濾過、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマト、電気泳動法等が挙げられる。モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトによる精製は、特開平5-97号公報に開示されているモノクローナル抗体を用いて精製することができる。得られた精製TCF-IIは、凍結乾燥あるいは凍結保存することができる。その他、TCF-IIと同様の活性を有するものであれば、本発明と同様の薬剤として利用可能である。例えば、TCF-II蛋白質と5アミノ酸の違いを有する蛋白質である肝細胞増殖因子（HGF；特開昭63-22526号）、あるいは精製Scatter Factor（SF；Gherardi and Stocker, Nature, 346, 228 (1990)）などが挙げられる。

本発明の悪液質予防及び／又は治療剤は、注射剤として静脈、筋肉内、あるいは皮下より投与することができる。これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じ製造され、必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤等を添加することができる。本発明の製剤を患者に投与する場合、投与患者の症状の程度、健康状態、年齢、体重等の条件によって異なり、特に限定されないが、成人1日当たり精製TCF-IIとして0.6mg～600mg、好ましくは6mg～60mgを含有する製剤を1日1回

若しくはそれ以上投与すれば良い。

### 実施例

次に製造例、実施例をもって本発明を説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

#### 〔製造例 1〕

##### T C F - II の精製

W090/10651号公報に開示された方法、及び東尾らの方法 (Higashio, K. et al, B.B.R.C., vol. 170, pp397-404 (1990)) に準じて細胞を培養し、精製 T C F - II を得た。即ち、ヒト線維芽細胞 I M R - 90 (ATCC CCL-186) を 5 % 仔牛血清を含む D M E M 培地 100ml を入れたローラーボトルに  $3 \times 10^6$  個移植し、0.5 ~ 2 回転/分の回転速度で回転させながら 7 日間培養を続けた。総細胞数が  $1 \times 10^7$  個になったところでトリプシンにより細胞を剥離し細胞をボトル底面に集め、5 ~ 9 メッシュのセラミック 100g (東芝セラミック社) を殺菌して投入し、24 時間静置して培養した。その後、上記培養液を 500ml 加え、培養を継続した。7 ~ 10 日ごとに培地を全量回収し、新鮮培地を補給した。このようにして 2 ヶ月間生産を継続し、ローラーボトル一本当たり 4L の培養液を回収した。このようにして得た培養液当たりの比活性は  $32 \mu\text{g/ml}$  であった。培養液 750L をメンブランフィルター (MW6000 カット; アミコン社) 処理により U F 濃縮し、C M セファデックス C-50 (ファルマシア社)、ConA セファロース (ファルマシア社)、MonoS カラム (ファルマシア社)、ヘパリンセファロース (ファルマシア社) による 4 段階のクロマト精製を行い、精製 T C F - II を得た。

#### 〔製造例 2〕

##### 遺伝子組換え T C F - II の生産

W092/01053号公報に開示された方法に従い、T C F - II 遺伝子を組み込んだ細胞を培養し、精製 T C F - II を得た。形質転換ナマルワ (Namlwa) 細胞を培養し、培養液 20L を得た。この培養液を C M - セファデックス C-50 クロマト (ファ

ルマシア社)、Con-A セファロースCL-6B クロマト(ファルマシア社)、MonoS カラム(ファルマシア社)を装着したHPLCの順に処理を行い、約11mgの精製TCF-IIを得た。

〔製造例3〕

TCF-II製剤の製造

実施例1及び2により得られたTCF-IIの、注射剤の製造例を示す。

- |     |           |            |
|-----|-----------|------------|
| (1) | TCF-II    | 20 $\mu$ g |
|     | ヒト血清アルブミン | 100mg      |

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

- |     |           |            |
|-----|-----------|------------|
| (2) | TCF-II    | 40 $\mu$ g |
|     | ツイーン80    | 1mg        |
|     | ヒト血清アルブミン | 100mg      |

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

- |     |        |            |
|-----|--------|------------|
| (3) | TCF-II | 20 $\mu$ g |
|     | ツイーン80 | 2mg        |
|     | ソルビトール | 4g         |

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

- |     |        |            |
|-----|--------|------------|
| (4) | TCF-II | 40 $\mu$ g |
|     | ツイーン80 | 1mg        |
|     | グリシン   | 2g         |

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

- |     |        |            |
|-----|--------|------------|
| (5) | TCF-II | 40 $\mu$ g |
|     | ツイーン80 | 1mg        |



7

ソルビトール	2g
グリシン	1g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(6) T C F - II	20 $\mu$ g
ソルビトール	4g
ヒト血清アルブミン	50mg

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(7) T C F - II	40 $\mu$ g
グリシン	2g
ヒト血清アルブミン	50mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(8) T C F - II	40 $\mu$ g
ヒト血清アルブミン	50mg

上記組成をpH6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

#### 〔実施例1〕

##### ヒト肝細胞癌移植担癌マウスの悪液質に対するT C F - II投与の効果

移植するヒト肝細胞癌株は、in vitroの予備実験においてT C F - IIにより細胞増殖、あるいは細胞分散傾向が観察されたK Y N-2株およびK Y N-3株を用いた。何れの細胞株も、ダルベッコM E N培地（日水製薬社）に100U/ml ペニシリン、100  $\mu$  g/mlストレプトマイシン（ギブコ社）、12mmol/L炭酸水素ナトリウム、20%熱不活化仔牛血清（Whittaker Bioproducts 社）を加えた培養液で36℃、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%の条件下で静置培養を行った。この両細胞株にそれぞれトリプシン-EDTAを加え細胞を分離し、リン酸緩衝液（P B S）で2回洗浄後

、 $2.0 \times 10^7$  個/ml となるよう細胞浮遊液を調製した。

4～5週齢の雌SCIDマウスの移植部分の皮膚を剃毛および70%エタノールで消毒し、エーテル麻酔後に23Gの注射針を用いて、先に調製した腫瘍細胞を移植した。KYN-2株( $1.0 \times 10^7$  個/匹)は背部皮下に、またKYN-3株( $1.0 \times 10^7$  個/匹)は腹腔内に細胞を移植した。KYN-2株皮下移植腫瘍については、直径が5 mmになった移植後3週目に、またKYN-3株腹腔内移植では移植後5週目に、これら移植マウスをそれぞれ4群に分けた。溶媒のみを投与した対照群をI群、0.3mg/kg/日TCF-II投与群をII群、3.0mg/kg/日TCF-II投与群をIII群、30mg/kg/日TCF-II投与群をIV群とした。TCF-IIの投与はKYN-2株移植マウスでは腹腔内に、KYN-3株移植マウスでは皮下に、1日2回2週間行った。

KYN-2株皮下移植腫瘍マウスの実験においては、TCF-II投与前の体重と投与終了時の体重を測定した。又、KYN-3を用いた実験においては、TCF-IIの投与前後に、エーテル麻酔下に眼底動脈からヘパリン処理したヘマトクリット毛細管(テルモ社)を用いて採血し、常法で遠心した後直ちにヘマトクリット値を測定した。さらに、TCF-II投与終了時にエーテル麻酔下に解剖を行い腹水中TNF値をFactor-Test-XTM Mouse TNF ELISA キット(ジェンザイム社)を用いて測定した。吸光度測定にはEasy Reader EAR 400 (SLTラボインストゥルメンツ社)を用いた。

溶媒およびTCF-II投与群の体重変化を第1図に示す。溶媒投与群(I群)では、体重は2週間で約20%と著しい低下を認めた。一方、TCF-II投与群(II～IV群)においては、投与量に依存して体重減少が抑制され、特にIV群においては投与前後で有意差は認められず、また投与後体重がI群の投与後体重に比較して明らかに高値を示した。次に、溶媒およびTCF-II投与群のヘマトクリットの変化を第2図に示す。TCF-II投与により、担癌マウスのヘマトクリット値は改善し、癌増殖に伴う貧血の進行が抑制される傾向が認められた。さらにTCF-IIの上昇抑制効果を第3図に示す。担癌生体の悪液質の原因であるTNF

は、TCF-IIの投与量に依存し、また最低用量である0.3mg/kg/日のII群から顕著な低下を示した。即ち、TCF-IIの投与により、癌増殖による体重減少、貧血の進行、TNFの上昇などの悪液質の状態を著しく改善した。

#### 産業上の利用可能性

上記のことから理解されるように、本発明により、癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、心臓疾患、感染症、ショック、熱傷、エンドトキシン血症、臓器炎、手術、糖尿病、膠原病、放射線治療、又は化学療法からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した悪液質に対する優れた予防及び／又は治療剤が提供され、医薬として有用である。

請 求 の 範 囲

1. 腫瘍細胞障害因子-II(Tumor Cytotoxic Factor-II:TCF-II)を有効成分とする悪液質予防及び／又は治療剤。
2. 悪液質が、癌の要因に基づき発症したものである、請求項1記載の悪液質予防及び／又は治療剤。

1 / 2

図 1

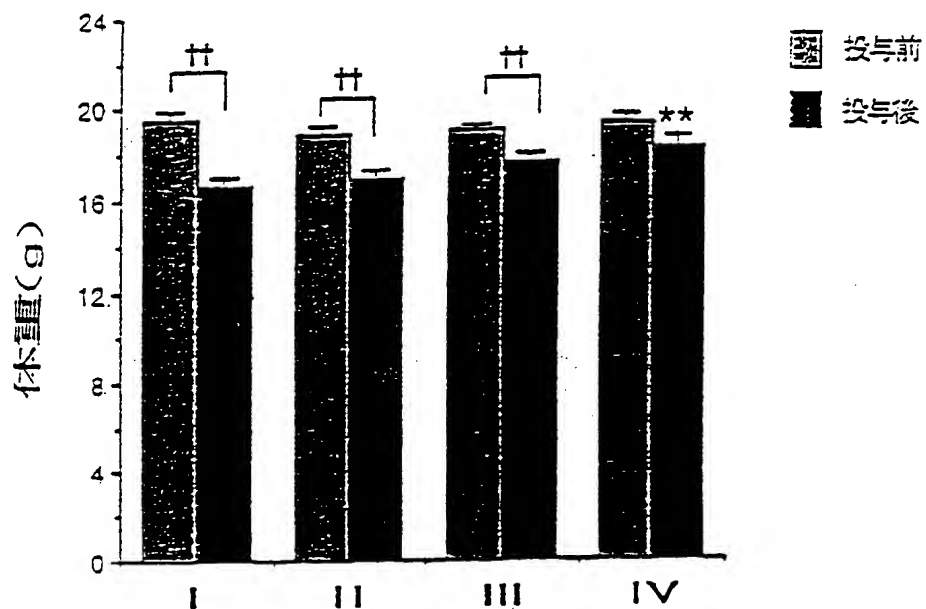
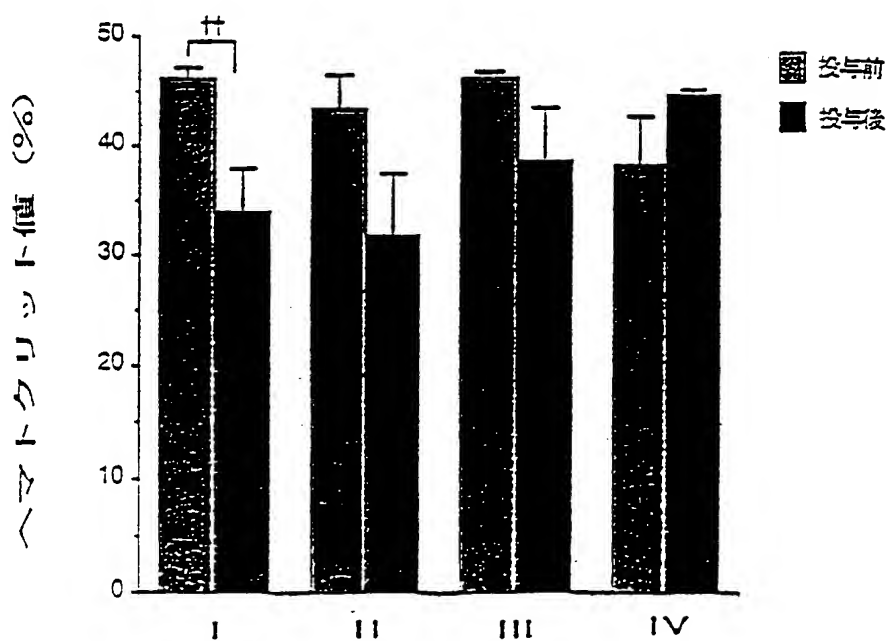
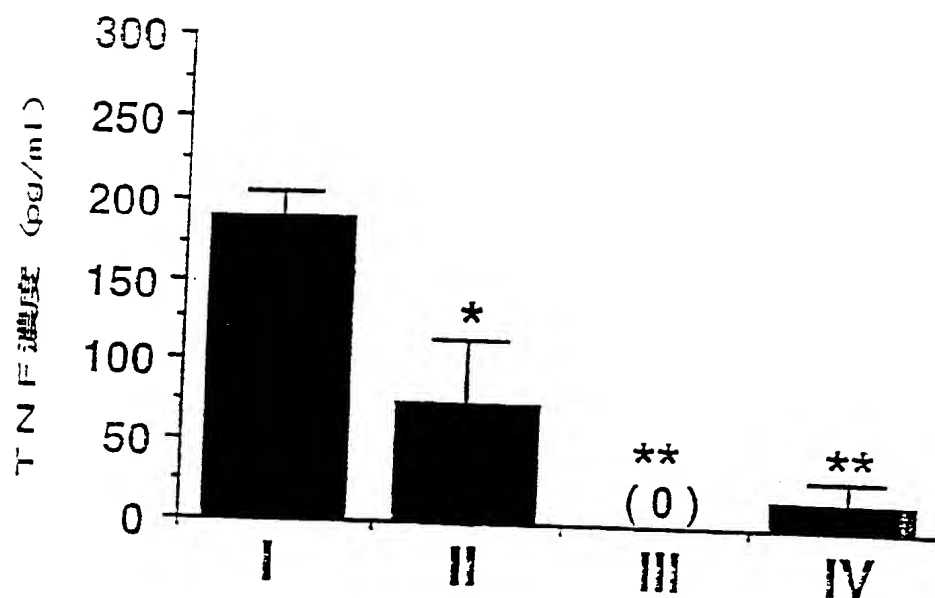


図 2



2 / 2

図 3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/00999

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> A61K38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>6</sup> A61K38/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), WPIDS (STN), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 8-176007, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), July 9, 1996 (09. 07. 96),	1
Y	Column 3 & WO, 96/20004, A1 & EP, 754051, A1	2
Y	Masaetsu Tamaguma et al., "Cancer Cachexia and	2
A	Cachexin (in Japanese)", Strides of Medicine, 1989, Vol. 149, No. 5, pp.371-373	1
A	Nobuyuki Shima et al., "Structure of Tumor Cell Damage Factor (F-TCF) and Various Bioactivity", The Japanese Journal of Clinical Medicine, 1992, Vol. 50, No. 3, pp.270-274	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
May 18, 1998 (18. 05. 98)

Date of mailing of the international search report  
May 26, 1998 (26. 05. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00999

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. A 61 K 38/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. A 61 K 38/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), WPIDS (STN), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 8-176007, A (雪印乳業株式会社), 9. 7月, 1996 (09. 07. 96), Column 3	1
Y	& WO, 96/20004, A1, & EP, 754051, A1	2
Y	玉熊 正悦ほか, '癌悪液質とカケクチン', 医学のあゆみ, 1989, 149巻, 5号, pp. 371-373	2
A		1
A	島 伸行ほか, '腫瘍細胞障害因子 (F-TCF) の構造ならびに各種生 物活性', 日本臨床, 1992, 50巻, 3号, pp. 270-274	1, 2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって目明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 05. 98

国際調査報告の発送日

26.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C 9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3452



## Specification

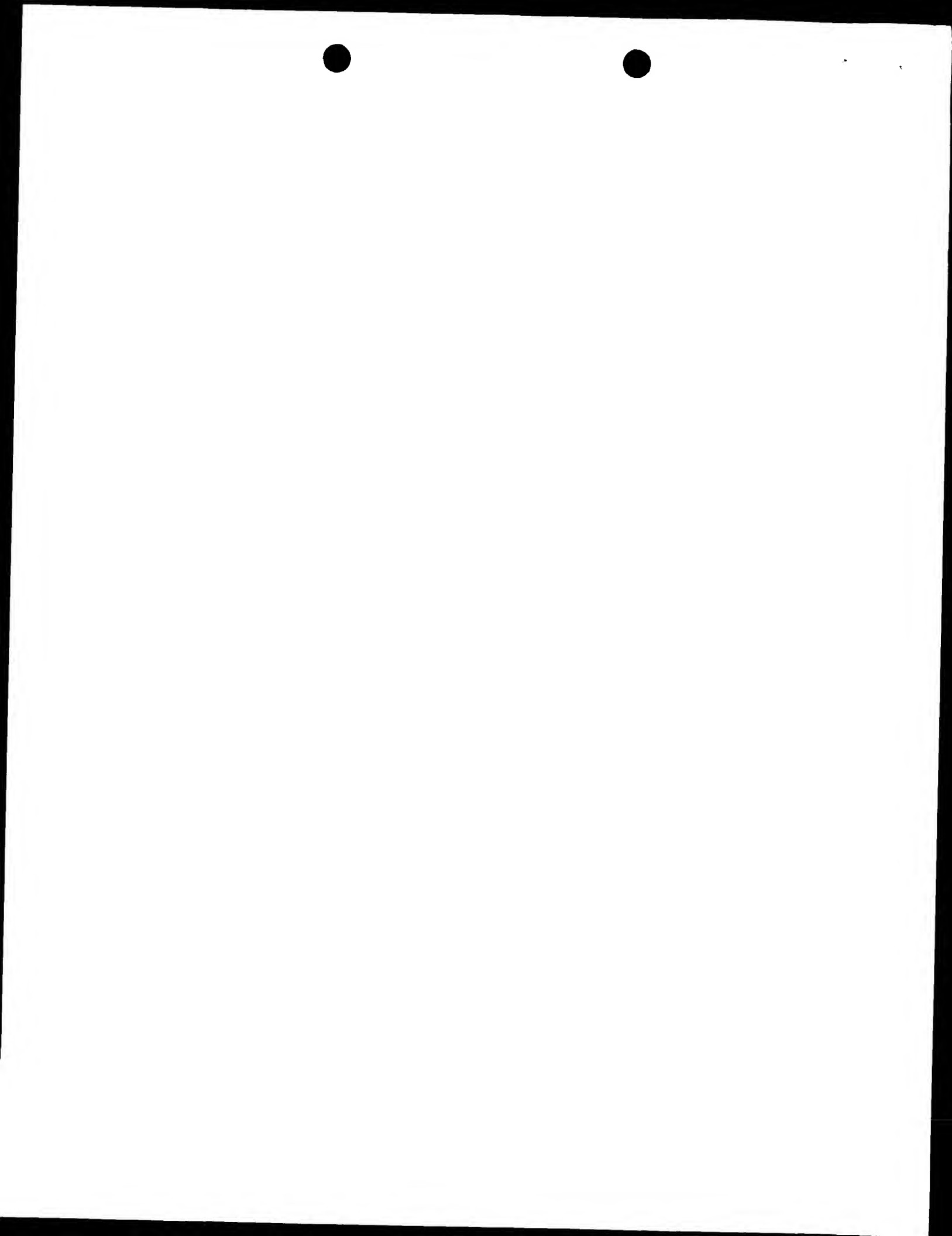
Agent for preventing and/or treating cachexia

## Technical field

The present invention relates to an agent for preventing and/or treating cachexia comprising Tumor Cytotoxic Factor-II (TCF-II) as an effective ingredient. An excellent agent for preventing and treating cachexia caused by one of the factors selected from the group consisting of cancer, acquired immunodeficient syndrome (AIDS), cardiac diseases, infectious disease, shock, burn, endotoxinemia, organ inflammation, surgery, diabetes, collagen diseases, radiotherapy, chemotherapy is provided by the present invention and useful for medicine.

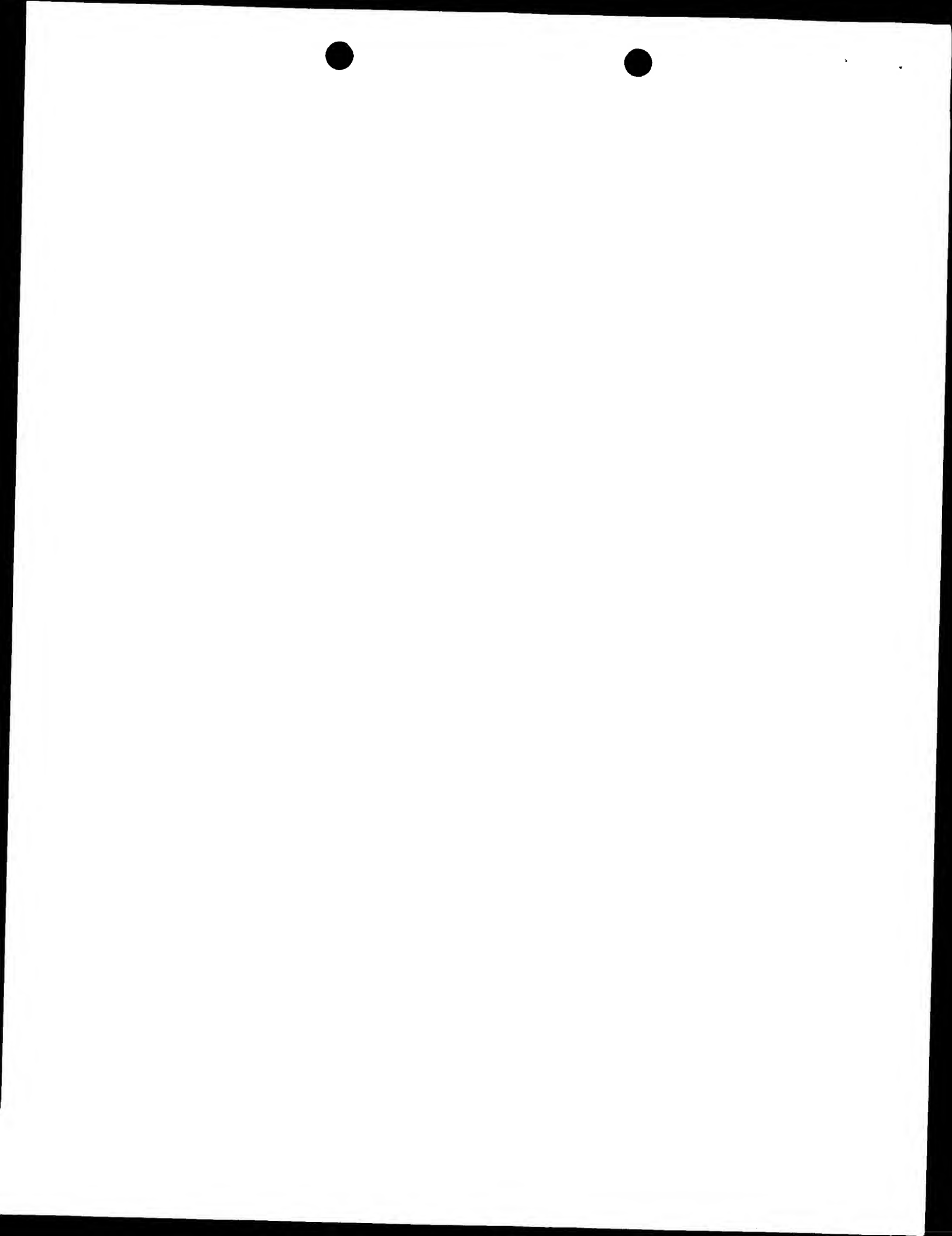
## Background Technology

Generally, such a disease as cancer, acquired immunodeficiency (AIDS), cardiac disease etc. will accompany with anorexia, weight loss, physical exhaustion, marasmus, dermatrophia, xerosis, anemia, edema, abnormal blood coagulation-fibrinolysis etc. and these pathology is defined as cachexia. After suffering from this systemic marasmus, a patient will eventually die (Tamaguma, M. et.al., Igakuno-ayumi, 149, 371-373 (1989)). Further, if radiotherapy



and/or chemotherapy is carried out for a patient with progressive or terminal cancer for whom curative operation can not be expected, it may lead to extremely lowered biological body defensive function such as immunological function due to specific malnutrition, resulting in shortening life. Therefore, these are serious problems in practical treatment thereof. The cause of cachexia has been so far considered to be triggered by imbalance of nutritional equilibrium between (lowered) nutrition intake and (increased) nutrition consumption and affection of humoric factor mobilized from cancer or lesion on systemic metabolism. From the above situations, positive alimentation is carried out using total parental nutrition in order to supplement extreme nutritional or energetic deficiency and enhance immunological function in the treatment of cachexia. However, in cachexia, intake of energy will be used not for saving patient's life but for proliferation of tumor cell, so that alimentation can not be sufficient treatment.

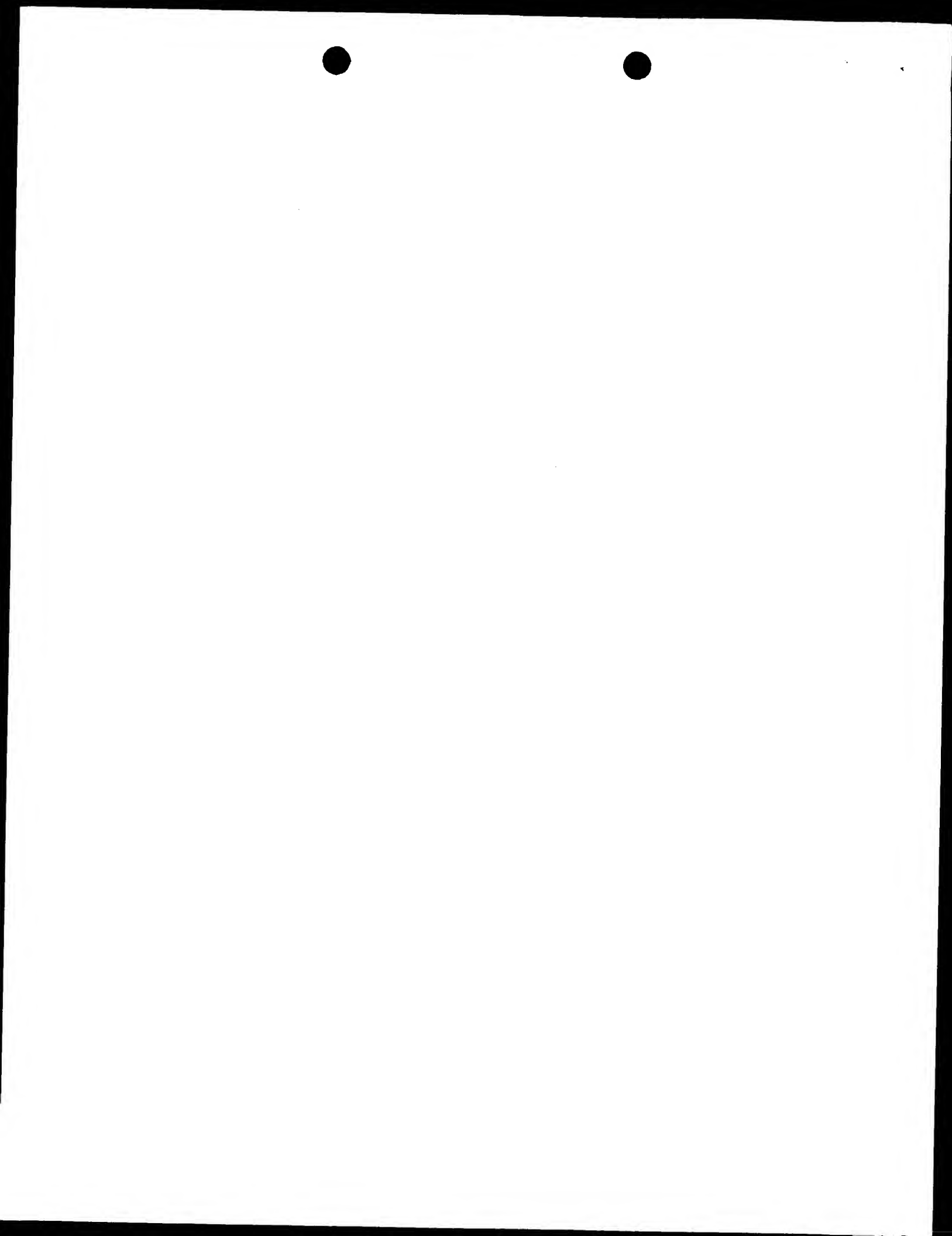
Recently, monokine or cytokine, such as Tumor Necrosis Factor (TNF), mobilized from macrophage is paid attention as cause of cachexia. TNF was found as a factor of affecting tumor cell and elucidated to be secreted by macrophage which is one of immunocytes and has a phagocytic action. Though it was originally expected as anti-cancer drug because of its direct cytotoxic effect and strong



anti-tumor activity, recently various kinds of action of TNF have been investigated since it was found that it cause cachexia that is marasmus including weight loss of a patient with cancer or severe infection disease or a ringleader cytokine inducing inflammation. The main actions are (1) osteoclastic action, (2) induction of hyperlipidemia by inhibition of uptake of lipid into cell, (3) induction of production of interleukine 1 and colony stimulation factor, (4) impairment of angioendothelial cell, (5) intervening reaction of exotoxin shock in grave infectious disease. Though an agent for treating cachexia accompanied with cancer, acquired immunodeficient syndrome (AIDS), cardiac diseases, infectious disease, shock, burn, endotoxemia, organ inflammation, or these diseases themselves or various kinds of inflammatory diseases including chronic rheumatoid arthritis and inflammatory gut disease are expected to be developed, in fact, there is no satisfiable agent at present.

#### Disclosure of the Invention

The present inventors eagerly investigated to look for an agent for treating cachexia and found that TCF-II known as tumor cytotoxic factor had an excellent effect of preventing and treating cachexia. Accordingly, an object of the present invention is to provide an agent for preventing and treating cachexia caused by cancer, acquired



immunodeficient syndrome(AIDS), cardiac diseases, infectious disease, shock, burn, endotoxemia, organ inflammation, surgery, radiotherapy, chemotherapy etc., comprising TCF-II as an effective ingredient.

The present invention relates to an agent for preventing and/or treating cachexia comprising TCF-II as an effective ingredient.

An agent for preventing and treating cachexia caused by one of the factors selected from the group consisting of cancer, acquired immunodeficient syndrome(AIDS), cardiac diseases, infectious disease, shock, burn, endotoxemia, organ inflammation, surgery, diabetes, collagen diseases, radiotherapy and chemotherapy is provided by the present invention and useful for medicine.

#### Brief description of the drawings

Figure 1 shows an improving effect of TCF-II on weight loss in mice with transplanted KYN-2 cell in example 1. (++) in the figure means significant difference ( $p < 0.01$ ) between before and after administration and (\*\*) means significant difference ( $p < 0.01$ ) from I group after administration.

Figure 2 shows an improving effect of TCF-II on lowered hematocrit value in mice with transplanted KYN-3 cell in example 1. (++) in the figure means significant difference ( $p < 0.01$ ) between before and after administration.





Figure 3 shows a suppressing effect on elevated TNF in ascites of mice with transplanted KYN-3 cell in example 1.

(\*) in the figure means significant difference ( $p < 0.05$ ) from I group and (\*\*) means significant difference ( $p < 0.01$ ) from I group.

Best mode of embodiment for the practice of the present invention

TCF-II which is an effective ingredient of the present invention is known protein derived from human fibroblast having the following characteristics:

1) Molecular weight (by SDS electrophoresis)

under non-reducing conditions:  $78,000 \pm 2,000$  or  $74,000 \pm 2,000$

under reducing conditions:  $52,000 \pm 2,000$  (common band A)

$30,000 \pm 2,000$  (band B)

$26,000 \pm 2,000$  (band C)

2) Isoelectric point: 7.4-8.6

The above TCF-II can be obtained by adsorbing culture medium of human fibroblast on an ion exchange column then purifying the elute by affinity chromatography (WO 90/10651) or by genetic engineering manipulation (WO 92/01053). TCF-II which is an effective ingredient of the present invention can be derived from fibroblast or produced by



genetic engineering manipulation using microbial organism or other cell as based on the genetic sequence described in WO 90/10651. Further, TCF-II obtained by genetic engineering manipulation described in WO 92/01053 can be also used. TCF-II with different carbohydrate chain or without carbohydrate chain due to difference of host cell or microbial organism can be also used. However, one with carbohydrate chain can be preferably used. TCF-II obtained by these methods can be concentrated and purified by usual isolation and purification method. For example, precipitation with organic solvent, salting out, gel permeation, affinity chromatography using monoclonal antibody, electrophoresis can be exemplified. Purification by affinity chromatography using monoclonal antibody can be carried out using monoclonal antibody described in a Japanese unexamined laid open patent application No.97(1993). The obtained TCF-II can be lyophilized or kept frozen.

Substance having the same activity as TCF-II can be used as the agent of the present invention. For example, hepatocyte growth factor (HGF; Japanese unexamined laid-open patent application No.22526 (1988)) which is formed by insertion of 5 amino acids into TCF-II protein or purified Scatter Factor (SF;Gherardi and Stocker, Nature, 346, 228 (1990)) can be exemplified.

The agent of the present invention for preventing and/or



treating cachexia can be administered intravenously, intramuscularly or subcutaneously. These pharmaceutical preparations can be prepared according to a known pharmaceutical preparation method and, if necessary, pH conditioner, buffer and/or stabilizer can be added thereto. Dose of the present agent can be different depending on the severeness of symptom, health conditions, age, body weight of a patient. Though the dose will not be restricted, pharmaceutical preparation comprising 0.6mg-600mg-TCF-II/day, preferably 6mg-60 mg-TCF-II/day, for one adult person can be administered at once or more.

#### Example

The present invention will be described below in detail by exemplifying examples. However, these are only examples and the present invention will not be limited therewith.

#### Manufacturing example 1

#### Purification of TCF-II

According to a method described in WO 90/10651 and a method of Higashio et al (Higashio, K. et. al, B.B.R.C., vol.170, pp397-404(1990)), cell was cultured and purified TCF-II was obtained. That is,  $3 \times 10^6$  human fibroblast IMR-90 (ATCC CCL-186) cells were placed in a roller bottle containing 100 ml DMEM medium including 5% calf fetal serum and cultured by rotating it at the rate of 0.5-2 rpm for 7 days.



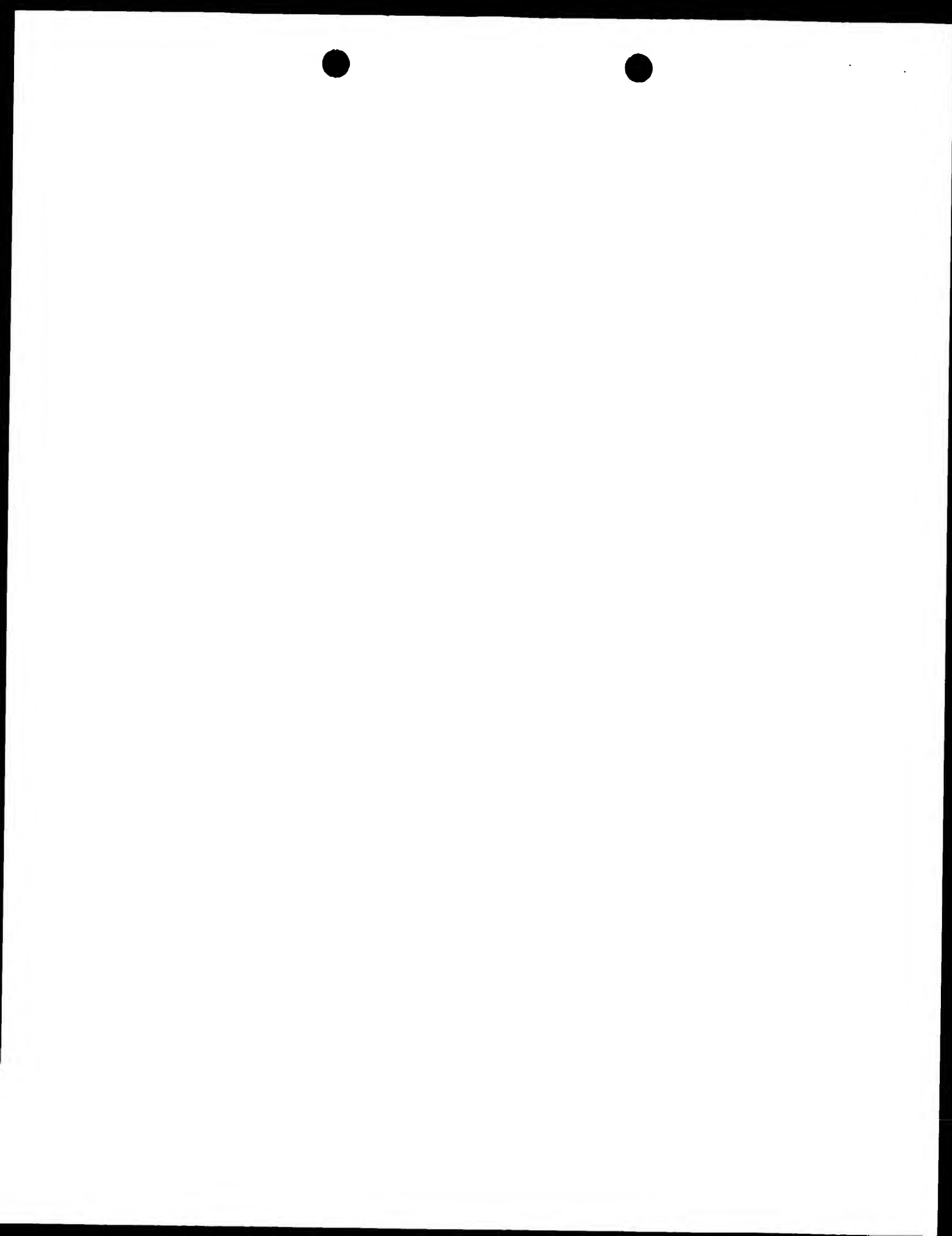
When the total number of cell reached  $1 \times 10^7$ , cells were deprived from the wall by trypsin digestion and collected at the bottom of bottle. And 100 g of ceramic with the size of 5-9 mesh (Toshiba Ceramic) was sterilized and put therein, which was cultured for 24 hours. After then, 500 ml of the above culture medium was added thereto and the culture was continued. The total volume of culture medium was recovered every 7-10 days and fresh medium was supplemented.

Production was kept for 2 months like this and 4 liters of culture medium was recovered per a roller bottle. Specific activity of TCF-II in culture medium obtained as above was  $32 \mu\text{g/ml}$ . Culture medium (750 L) was concentrated by ultrafiltration using membrane filter (MW 6,000 cut; Amicon) and purified by 4-steps chromatography, that is, CM-Sephadex C-50 (Pharmacia), Con-A Sepharose (Pharmacia), Mono S column (Pharmacia), Heparin-Sepharose (Pharmacia) to yield purified TCF-II. This TCF-II had the same molecular weight and isoelectric point as described before.

#### Manufacturing example 2

##### Production of recombinant TCF-II

According to the method described in WO 92/01053, cell transformed with TCF-II gene was cultured and purified TCF-II was obtained. That is, transformed Namalwa cell was cultured and 20 l of culture medium was obtained. This culture medium was treated by CM-





sphadex C-50 chromatography, Con-A Sepharose CL-6B chromatography and finally HPLC equipped with a Mono S column to yield about 11 mg of recombinant TCF-II.

### Manufacturing example 3

#### Manufacturing of pharmaceutical preparation of TCF-II

An example of manufacturing injections of TCF-II obtained in example 1 and 2 was shown.

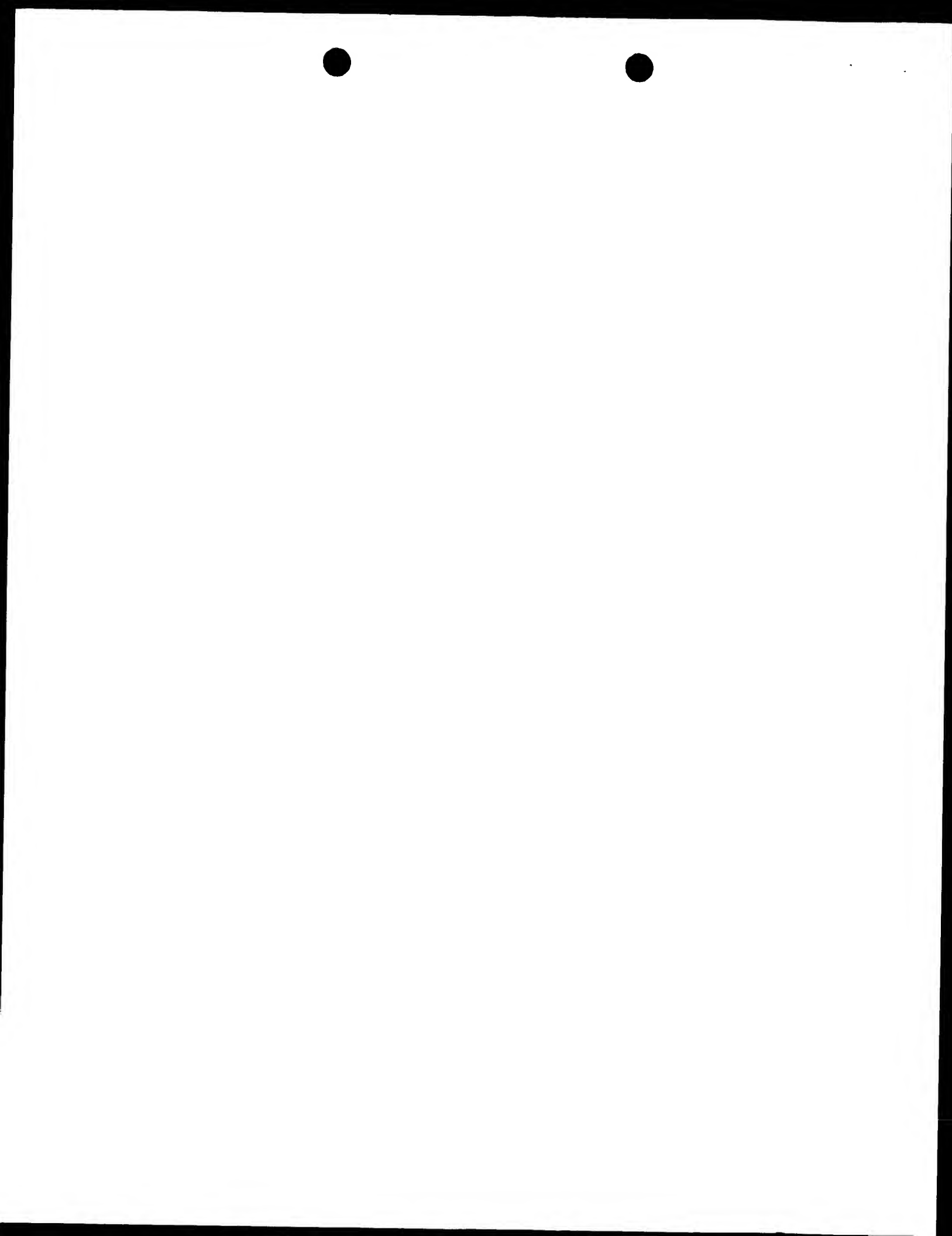
(1) TCF-II	20 $\mu$ g
human serum albumin	100 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(2) TCF-II	40 $\mu$ g
Tween 80	1 mg
human serum albumin	100 mg

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(3) TCF-II	20 $\mu$ g
------------	------------



Tween 80	2 mg
Sorbitol	4 g

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

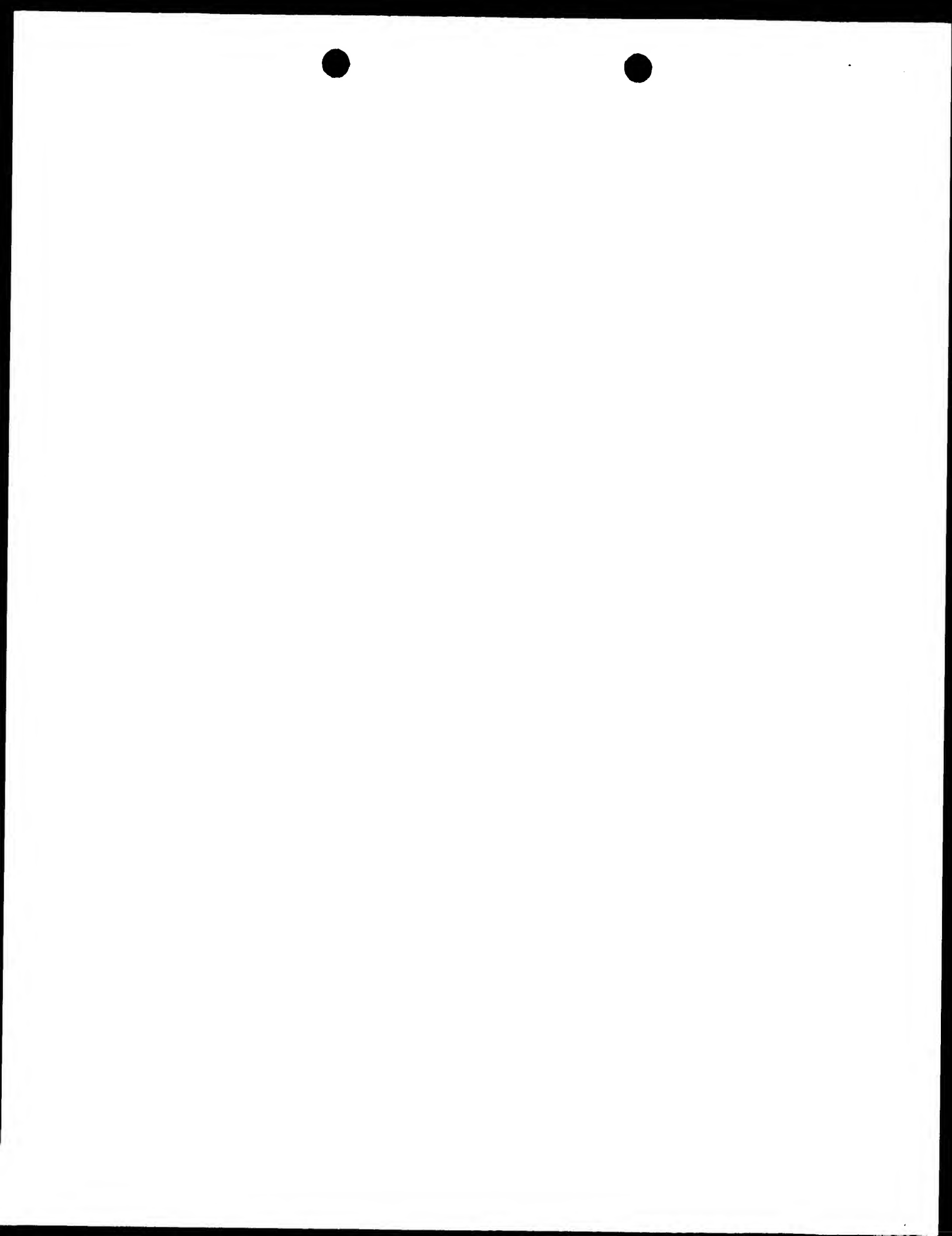
(4) TCF-II	40 $\mu$ g
Tween 80	1 mg
Glycine	2 g

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(5) TCF-II	40 $\mu$ g
Tween 80	1 mg
Sorbitol	2 g
Glycine	1 g

The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(6) TCF-II	20 $\mu$ g
------------	------------



Sorbitol	4 g
human serum albumin	50 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(7) TCF-II	40 $\mu$ g
Glycine	2 g
human serum albumin	50 mg

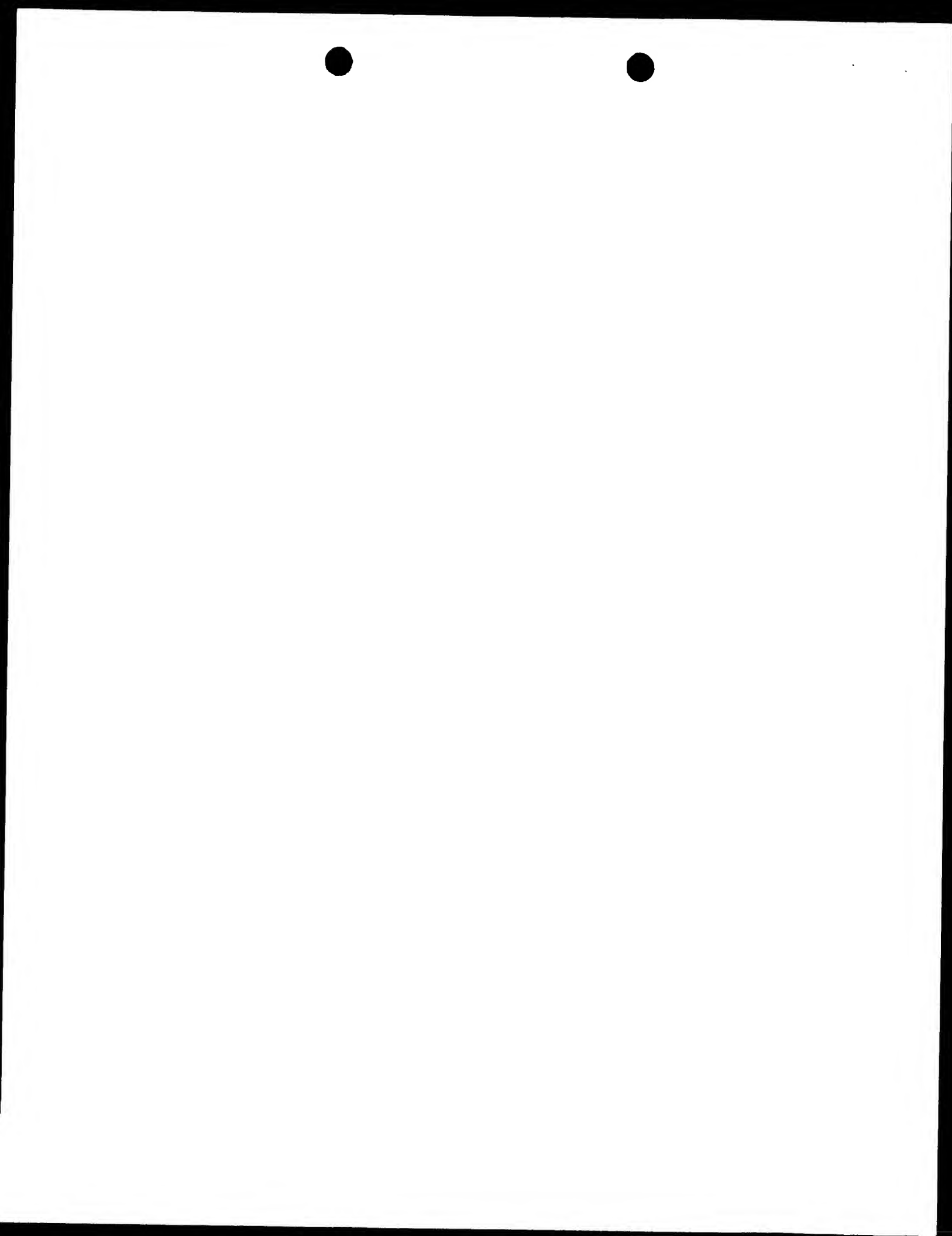
The above composition was dissolved in physiological saline solution for injections so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

(8) TCF-II	40 $\mu$ g
human serum albumin	50 mg

The above composition was dissolved in citric acid buffer solution with pH 6.03 so that the total volume would be 20ml. Then it was divided into vials containing 2 ml each after sterilization and sealed after lyophilization.

[Example 1]

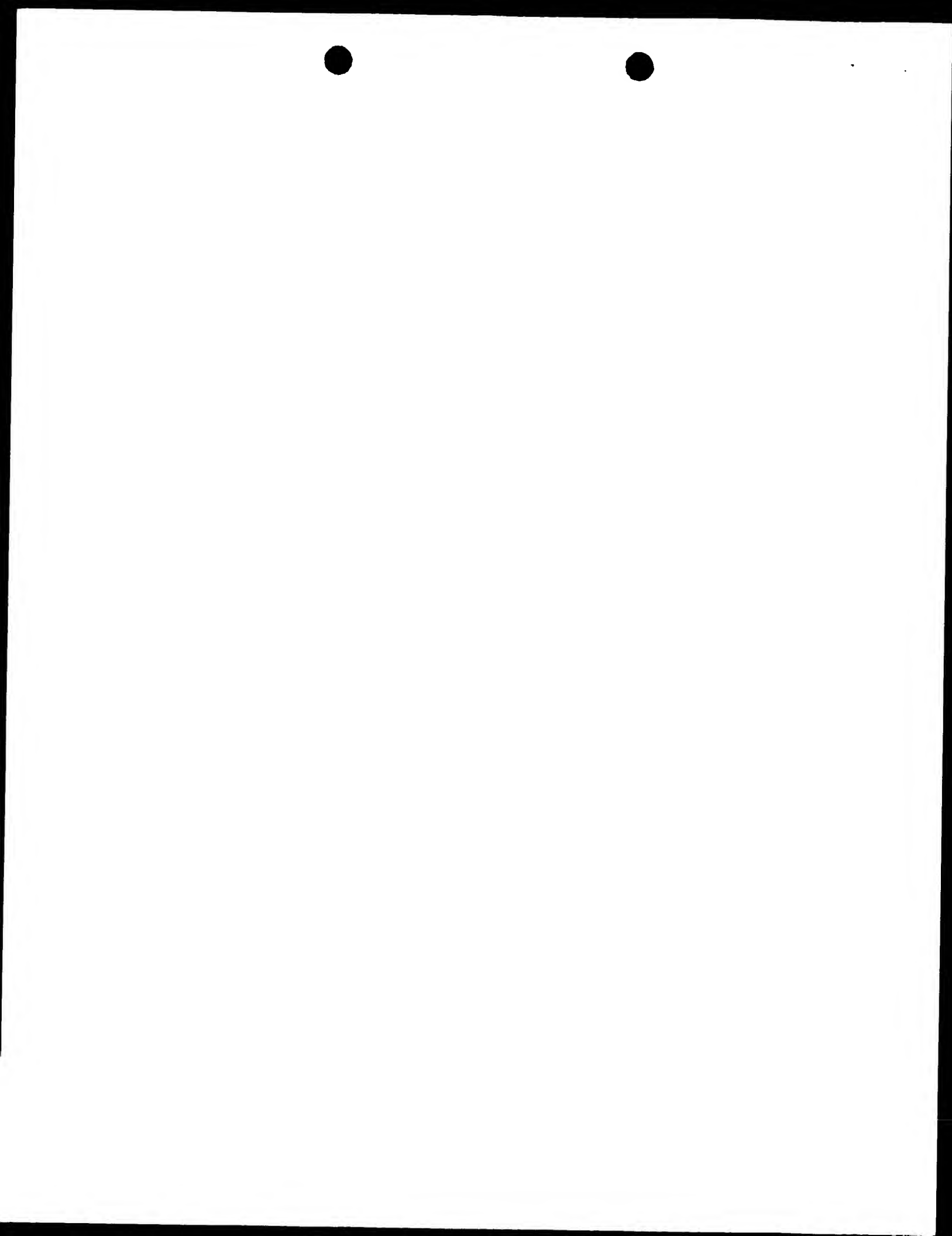
Effect of TCF administration against cachexia in mice with



transplanted human hepatocellular carcinoma

As transplanted human hepatocellular carcinoma, KYN-2 cells line or KYN-3 cell line which show proliferation or cell dispersion in preliminary experiment in vitro was used. Static culture of either cell line was carried out using Dulbecco's MEM medium (Nissui-seiyaku) containing 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco), 12 mmol/L sodium bicarbonate, 20% heat-inactivated calf serum (Whittaker Bioproducts) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. After trypsin-EDTA was added to both of the cultured cell lines, cells were separated, washed twice with phosphate buffer solution (PBS) and prepared so as to be  $2.0 \times 10^7$  cell/ml cell suspension

After shaving hair on skin of transplantation site in 4-5 weeks old female SCID, disinfecting the site with 70% ethanol and ether anesthesia, tumor cell prepared beforehand was transplanted into the mice using 23 G syringe needle. KYN-2 cell line ( $1.0 \times 10^7$ ) was transplanted subcutaneously into animal's back and KYN-3 ( $1.0 \times 10^7$ ) was transplanted intraperitoneally. On 3 weeks after subcutaneous transplantation of KYN-2 cell line when the diameter of tumor became 5 mm and on 5 weeks after intraperitoneal transplantation of KYN-3 cell line, these mice with transplanted tumor were divided into 4 groups, respectively. Mice in I, II, III and IV groups were administered with vehicle, 0.3 mg-TCF-II/kg/day, 3.0 mg-TCF-II /kg/day and 30 mg-





TCF-II/mg/kg respectively. Twice a day for 2 weeks, TCF-II was intraperitoneally administered in mice with transplanted KYN-2 cell line and was subcutaneously administered in mice with transplanted NYK-3 cell line.

Body weight was weighed before and after administration in mice with subcutaneous transplanted KYN-2 cell line. Hematocrit was measured before and after administration of TCF-II by taking blood sample with hematocrit heparinized capillary (Termo) from ocular fundus artery under ether anesthesia in mice with KYN-3 and centrifuging it in a usual method. Then, TNF level in ascite was measured using Factor-Test-XTM Mouse TNF ELISA kit (Genzyme) after TCF administration and autopsy under ether anesthesia. Easy Reader EAR 400 (SLT Laboinstruments) was used in absorptiometry.

Body weight change in vehicle-administered group and TCF-II administered groups are shown in figure 1. In the vehicle-administered group (I group), body weight was significantly lost (about 20% loss) during 2 weeks. On the other hand, body weight loss was suppressed in a dose dependant manner in TCF-II administered groups. Especially in IV group, there was no significant difference before and after administration and, furthermore, body weight in IV group was clearly higher than that in I group after administration. Hematocrit change in vehicle-administered group and TCF-II administered groups was shown in

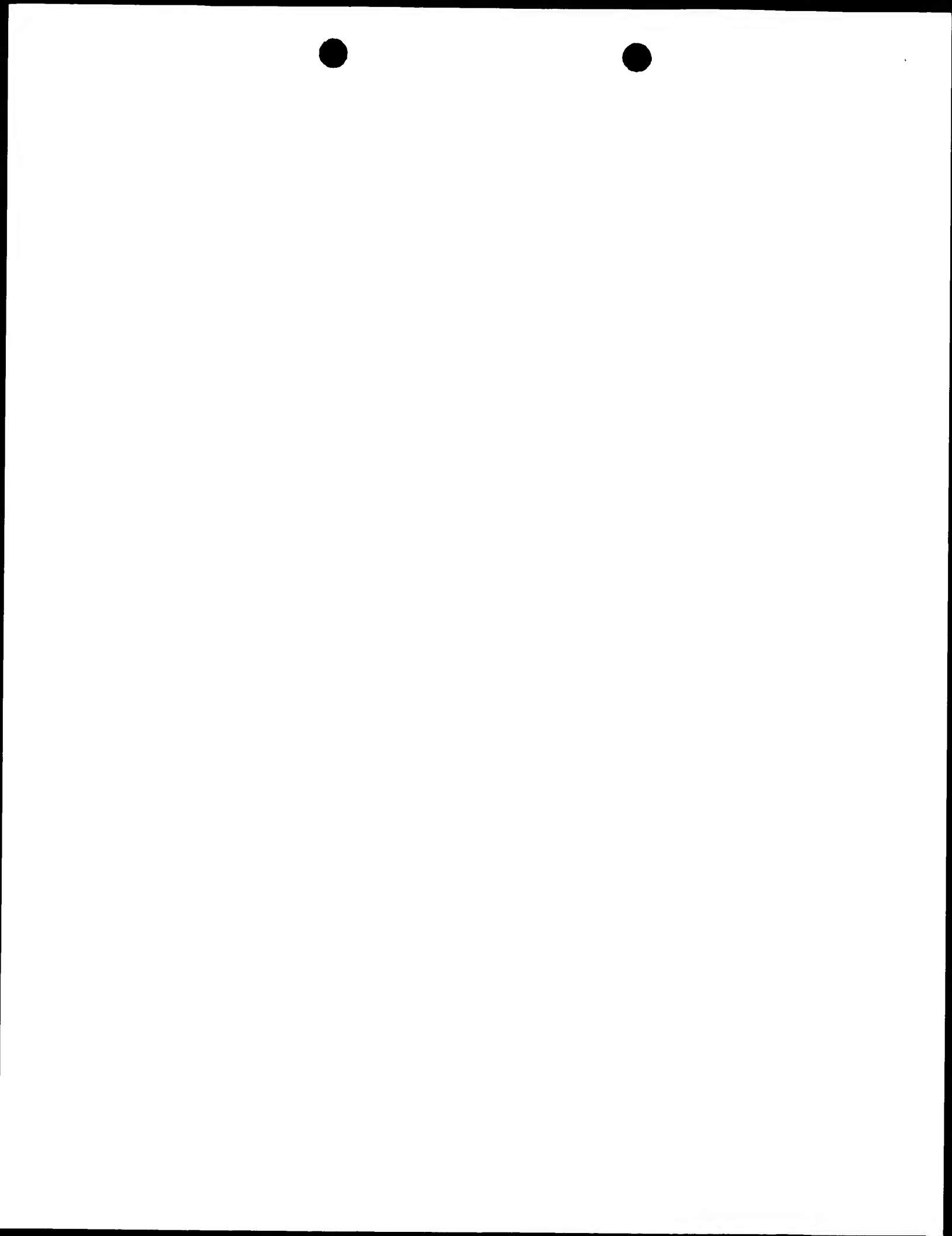


figure 2. By administration of TCF-II, hematocrit in mice with cancer was improved and progress of anemia accompanying with tumor proliferation was inclined to be suppressed. Further, suppressive effect of TCF-II on TNF elevation was shown in figure 3. TNF, which was a cause of cachexia in animals with cancer, was significantly lowered in a dose dependant manner by TCF II administration and significant suppression was observed even in II group administered with minimum dose of 0.3 mg/kg/day. That is, TCF-II administration significantly improved cachexia such as body weight loss caused by cancer proliferation, progress of anemia and elevation of TNF.

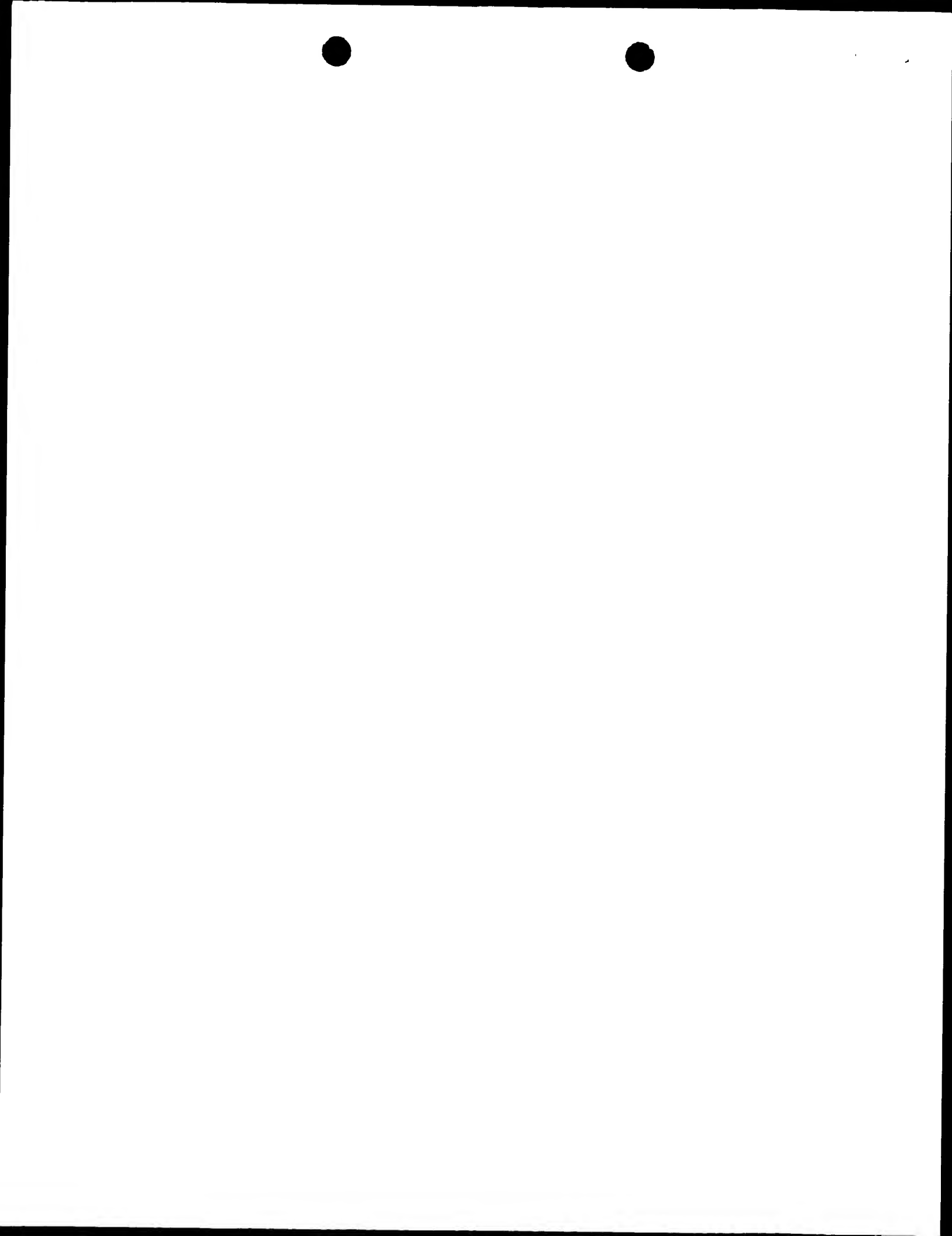
#### Industrial applicability

From what was described as above, An excellent agent for preventing and treating cachexia caused by one of the factors selected from the group consisting of cancer, acquired immunodeficient syndrome (AIDS), cardiac diseases, infectious disease, shock, burn, endotoxinemia, organ inflammation, surgery, diabetes, collagen diseases, radiotherapy and chemotherapy is provided by the present invention and useful for medicine.



## Claims

1. An agent for preventing and/or treating cachexia comprising TCF-II as an effective ingredient.
2. The agent for preventing and/or treating cachexia according to claim 1 wherein said cachexia is caused by cancer.



## Abstract

The present invention provides an agent for preventing and/or treating cacheria comprising TCF-II as an effective ingredient. An excellent agent for preventing and treating cachexia caused by cancer, acquired immunodeficient syndrome (AIDS), cardiac diseases, infectious disease, shock, burn, endotoxemia, organ inflammation, surgery, diabetes, collagen diseases, radiotherapy, chemotherapy is provided by the present invention and useful for medicine.

